

⑤ Int.Cl.<sup>5</sup>

A 61 K 37/02

識別記号

ADU

庁内整理番号

8317-4C

⑬ 公開 平成4年(1992)3月11日

審査請求 未請求 請求項の数 1 (全4頁)

⑭ 発明の名称 癌転移抑制剤

⑰ 特 願 平2-188509

⑱ 出 願 平2(1990)7月17日

⑲ 発 明 者 東 市 郎 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号  
 ⑲ 発 明 者 濟 木 育 夫 北海道札幌市厚別区厚別北三条5丁目12番6号  
 ⑲ 出 願 人 東 市 郎 北海道札幌市南区真駒内上町5丁目3番2号  
 ⑲ 出 願 人 中外製薬株式会社 東京都北区浮間5丁目5番1号  
 ⑲ 代 理 人 弁理士 湯浅 恭三 外4名

PTO 2002-2545

S.T.I.C. Translations Branch

## 明 細 書

## 1. 発明の名称

癌転移抑制剤

## 2. 特許請求の範囲

ヒト顆粒球コロニー刺激因子を有効成分とする  
癌転移抑制剤。

## 3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は、医薬品の発明に関し、さらに詳しく  
はヒト顆粒球コロニー刺激因子(以下ヒトG-  
CSFと略記する)を有効成分とする癌の治療、  
特に癌の転移の抑制に有用な癌転移抑制剤に関す  
る。

(従来技術)

近年、癌は早期診断が進み、また、外科的手術  
の技術向上、放射線療法、化学療法剤  
及び免疫療法剤の開発により治療率が高まって来  
た。しかしながら、癌細胞は主病巣から離れた部  
位へ転移する性質を有しているため、癌の完全治  
療が依然として困難な状況にある。したがって、

転移を抑制する方法の開発が現在の癌治療の重要  
課題のひとつとなっている。

癌転移のメカニズムは、ほぼ次のような過程、  
すなわち、① 原発巣から癌細胞の遊離② 遊離  
癌細胞の組織内移動(浸潤)③ 癌細胞の脈管内移  
行④ 癌細胞の管腔内移動⑤ 癌細胞の定着⑥  
局所における癌細胞の定着と増殖、のような過程  
を経て、はじめて転移巣として認められるものにな  
る、と考えられる。また、全体的には循環系の  
フィルター的臓器である肺、肝及び骨への転移が  
臨床的には多く認められている。

しかし、癌転移メカニズムの詳細は依然として  
不明な点も残されている。

(発明が解決しようとする課題)

このような癌転移のメカニズムを前提とし、そ  
の各過程に応じて現在まで癌転移抑制剤の開発が  
進められてきたが、まだ効果の高い薬物は見つけ  
られていないのが現状である。したがって、癌転  
移抑制作用の強い薬物が望まれていた。

(課題を解決するための手段)

そこで、本発明者らは、鋭意研究の結果、肺、肝又は脾に高転移性を有する癌細胞を移植したマウスにヒトG-CSFを投与することにより、各臓器に転移した癌細胞の数が無投与群に比べ有意に減少していることを見出した。このことからヒトG-CSFが癌転移抑制剤として有用であることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明はヒトG-CSFを有効成分とする癌の治療に特に有用な癌転移抑制剤に関する。

以下、本発明を詳細に説明する。

G-CSFは、骨髄の前駆細胞(CFU-GM又はCFU-G)に作用して顆粒球の分化増殖・成熟化を促進する造血因子であるが、癌細胞の転移抑制に有効であるという知見は驚くべきことである。

本発明の癌転移抑制剤を患者に投与する際には、投与量、投与部位、投与時期、投与期間などは対象の患者の病状を配慮して決定される。

投与時期については、癌摘出手術や化学療法剤

などによる刺激によって転移が起こるとも言われていることから手術前又は後の適当な時期に投与することが望ましい。また、必要に応じて、放射線療法を行うと共に投与、又は、化学療法剤及び免疫療法剤との併用投与することによって、さらに効果が期待できる。

本発明に係るヒトG-CSFヒト又は、動物医薬用に適した医薬製剤として投与できる。このような製剤は公知の製剤学的製造法に準じ、必要な製剤担体や賦形剤を、さらには必要に応じて安定化剤、吸着防止剤などを配合して製造できる。たとえば、蒸留水又は、適当な緩衝液に溶解した後注射液として用いることができる。

本発明の目的で用いる場合の投与量は、たとえば、注射剤によって投与する場合、通常成人一人当たり0.1~1,000 $\mu$ g、好ましくは、1~500 $\mu$ gを1週間に1~7回投与すればよい。

なお、本発明の癌転移抑制剤の有効成分であるヒトG-CSFは公知の物質であり、純度の高いヒトG-CSFであればその由来が制限されるも

のではなく、たとえば、出願人が先に出願した、特公平1-44200号の公報又は、特公平2-5395号公報に記載されている方法によって得られたもの等のいずれも使用することができる。また、ヒトG-CSFの誘導体を用いることもできる。その中で、好ましいものとしては、次記表1のアミノ酸配列又はその一部で表されるヒトG-CSF活性を有するポリペプチド又はこのポリペプチドと糖鎖部とを有する糖蛋白質からなるヒトG-CSFが挙げられる。

表1

(Met)<sub>n</sub> Thr Pro Leu Gly Pro Ala Ser Ser Leu  
Pro Gln Ser Phe Leu Leu Lys Cys Leu Glu Gln  
Val Arg Lys Ile Gln Gly Asp Gly Ala Ala Leu  
Gln Glu Lys Leu (Val Ser Glu)<sub>m</sub> Cys Ala Thr  
Tyr Lys Leu Cys His Pro Glu Glu Leu Val Leu  
Leu Gly His Ser Leu Gly Ile Pro Trp Ala Pro  
Leu Ser Ser Cys Pro Ser Gln Ala Leu Gln Leu  
Ala Gly Cys Leu Ser Gln Leu His Ser Gly Leu  
Phe Leu Tyr Gln Gly Leu Leu Gln Ala Leu Glu  
Gly Ile Ser Pro Glu Leu Gly Pro Thr Leu Asp  
Thr Leu Gln Leu Asp Val Ala Asp Phe Ala Thr  
Thr Ile Trp Gln Gln Met Glu Glu Leu Gly Met  
Ala Pro Ala Leu Gln Pro Thr Gln Gly Ala Met  
Pro Ala Phe Ala Ser Ala Phe Gln Arg Arg Ala  
Gly Gly Val Leu Val Ala Ser His Leu Gln Ser  
Phe Leu Glu Val Ser Tyr Arg Val Leu Arg His  
Leu Ala Gln Pro (但しmは0または1を表し、nは0  
または1を表す)

実施例

以下本発明を実験例(毒性及び薬理効果)、実施例(製剤例)をあげて更に詳しく説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

#### 実験例1(毒性)

表Iに記載されたアミノ酸配列( $n=0, n=0$ )を有するヒトG-CSFを用いて6週令のSle: ddY系マウス(静脈内注射)において急性毒性試験を行ったところLD<sub>50</sub>は1,000 $\mu$ g/kg以上であった。

#### 実験例2(薬理効果)

肺に高転移性のLewis肺癌(3LL)細胞を $2 \times 10^5$ 個ずつ、それぞれC57BL/6マウス(1群5匹)の右足趾皮下に移植した。移植18日後に癌摘出手術を行い、手術後1~4日目及び7~10日目まで合計8回表Iに記載されたアミノ酸配列( $n=0, n=0$ )を有するヒトG-CSFをリン酸緩衝液に溶解して表IIに示した投与量で静脈内又は皮下注射した。対照群にはリン酸緩衝液を投与した。手術後14日目にマウスを解剖し、肺への転移コロニー数を測定した結果を表IIに示し

後17日目にマウスを解剖し、肝及び脾の重量を測定した結果を表IIIに示した。その結果、ヒトG-CSF投与群は静脈内2.0 $\mu$ g/マウスの投与量で対照群に比較して有意に肝及び脾転移抑制効果を示した。

表III

薬物	投与経路	投与量 ( $\mu$ g/マウス)	肝重量 (g)	脾重量 (平均 $\pm$ 標準偏差)
対照群			3.46 $\pm$ 0.68	0.20 $\pm$ 0.02
ヒトG-CSF	静脈内	2.0	1.81 $\pm$ 0.57**	0.15 $\pm$ 0.03*
正常			0.95 $\pm$ 0.08	0.08 $\pm$ 0.02

\*  $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$

#### 実験例4(薬理効果)

肺に高転移性のB16-BL6黒色腫細胞を $5 \times 10^5$ 個ずつ、それぞれC57BL/6マウス(1群5匹)の右足趾皮下に移植した。移植21日後に癌摘出手術を行い、手術後1~4日目及び7~10日目まで合計8回表Iに記載されたアミノ酸配列( $n=0, n=0$ )を有するヒトG-CSFをリン酸緩衝液に溶解し、表IVに示した投与量で静

た。その結果、ヒトG-CSF投与群は静脈内及び皮下投与のどちらも2.0 $\mu$ g/マウスで対照群に比較して有意かつ顕著な肺転移抑制効果を示した。

表II

薬物	投与経路	投与量 ( $\mu$ g/マウス)	肺転移数 (平均 $\pm$ 標準偏差)
対照群			20 $\pm$ 4
ヒトG-CSF	静脈内	0.2	17 $\pm$ 4
		2.0	1 $\pm$ 1*
ヒトG-CSF	皮下	0.2	9 $\pm$ 12
		2.0	4 $\pm$ 3*

\*  $p<0.001$

#### 実験例3(薬理効果)

肝及び脾に高転移性のL5178Y-ML25リンパ腫細胞を $2 \times 10^5$ 個ずつ、それぞれCDF1マウス(1群5匹)に静脈内注射により移植した。移植後1~4日目及び7~10日目まで合計8回表Iに記載されたアミノ酸配列( $n=0, n=0$ )を有するヒトG-CSFをリン酸緩衝液に溶解して表IIに示した投与量で静脈内注射した。一方、対照群にはリン酸緩衝液を投与した。移植

後14日目にマウスを解剖し、肝及び脾の重量を測定した結果を表IIIに示した。その結果、ヒトG-CSF投与群は静脈内及び皮下2.0 $\mu$ g/マウスの投与量で、また、静脈内0.2 $\mu$ g/マウスの投与量で対照群に比較して有意な肺転移抑制効果を示した。

表IV

薬物	投与経路	投与量 ( $\mu$ g/マウス)	肺転移数 (平均 $\pm$ 標準偏差)
対照群			43 $\pm$ 9
ヒトG-CSF	静脈内	0.2	22 $\pm$ 12
		2.0	8 $\pm$ 5*
ヒトG-CSF	皮下	0.2	18 $\pm$ 5*
		2.0	10 $\pm$ 7*

\*  $p<0.001$

#### 実施例1(製剤例)

表Iに記載されたアミノ酸配列( $n=0, n=0$ )を有するヒトG-CSF(10 $\mu$ Mリン酸緩衝液pH7)50 $\mu$ g/mlに非イオン界面活性剤であるポリソルベート20(Tween® 20:ポリオキシエ

チレンソルビンモノラウレート)を $0.1\text{mg/ml}$ となるように加え、 $\text{NaCl}$ にて浸透圧比を1に合わせた後、 $0.22\mu\text{m}$ のポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌する。得られた溶液を滅菌処理を施したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓で打栓し、続いてアルミニウムキャップにて巻き締めて注射用溶液製剤を得た。この注射用溶液製剤は $10^\circ\text{C}$ 以下の冷暗所に保存する。

**実施例2(製剤例)**

表1に記載されたアミノ酸配列( $m=0, n=1$ )を有するヒトG-CSF( $10\text{M}$ リン酸緩衝液 $\text{pH}7$ ) $100\mu\text{g/ml}$ に非イオン界面活性剤であるポリソルベート80(Tween<sup>®</sup>80:ポリオキシエチレンソルビンモノオレート)を $0.1\text{mg/ml}$ となるように加え、 $\text{NaCl}$ にて浸透圧比を1に合わせた後、 $0.22\mu\text{m}$ のポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌する。得られた溶液を滅菌処理を施したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓で打栓し、続いてアルミニウムキャップにて巻き締めて注射用溶液製剤を得た。

るポリソルベート80(Tween<sup>®</sup>80:ポリオキシエチレンソルビンモノオレート) $0.1\text{mg/ml}$ 、ゼラチン $10\text{mg/ml}$ 及びマンニトール $50\text{mg/ml}$ となるように加えて溶解した後、 $0.22\mu\text{m}$ のポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌する。得られた溶液を滅菌処理を施したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、凍結乾燥を行い注射用凍結乾燥製剤を得た。この注射用凍結乾燥製剤は室温以下の温度条件に保存し、注射用蒸留水にて用時溶解して使用する。

(発明の効果)

本発明のヒトG-CSFを有効成分とする癌転移抑制剤は、各種の癌に対し優れた転移抑制効果を有するが、とりわけ発生初期の癌の外科的手術前後の転移抑制治療に有用である。

特許出願人 中外製薬株式会社  
同 東京市

代理人 弁理士 湯浅 恭三  
(外4名)

この注射用溶液製剤は $10^\circ\text{C}$ 以下の冷暗所に保存する。

**実施例3(製剤例)**

表1に記載されたアミノ酸配列( $m=1, n=0$ )を有するヒトG-CSF( $10\text{M}$ リン酸緩衝液 $\text{pH}7$ ) $50\mu\text{g/ml}$ に非イオン界面活性剤であるポリソルベート20(Tween<sup>®</sup>20:ポリオキシエチレンソルビンモノラウレート) $0.1\text{mg/ml}$ 、HSA $10\text{mg/ml}$ 及びマンニトール $50\text{mg/ml}$ となるように加えて溶解した後、 $0.22\mu\text{m}$ のポアサイズを有するメンブランフィルターで濾過滅菌する。得られた溶液を滅菌処理を施したバイアル瓶中に充填し、同様に滅菌処理したゴム栓を半打栓し、凍結乾燥を行い注射用凍結乾燥製剤を得た。この注射用凍結乾燥製剤は室温以下の温度条件に保存し、注射用蒸留水にて用時溶解して使用する。

**実施例4(製剤例)**

表1に記載されたアミノ酸配列( $m=1, n=1$ )を有するヒトG-CSF( $10\text{M}$ リン酸緩衝液 $\text{pH}7$ ) $100\mu\text{g/ml}$ に非イオン界面活性剤であ

PTO 02-2545

CY=JP DATE=19920311 KIND=A  
PN=04-077436

CANCER METASTASIS INHIBITOR  
[Gan' Ten'i Yokuseizai]

Ichiro Azuma, et al.

UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE  
Washington, D.C. May 2002

Translated by: FLS, Inc.

PUBLICATION COUNTRY	(10):	JP
DOCUMENT NUMBER	(114):	04077436
DOCUMENT KIND	(12):	A
PUBLICATION DATE	(43):	19920311
PUBLICATION DATE	(45):	
APPLICATION NUMBER	(21):	02188509
APPLICATION DATE	(22):	19900717
ADDITION TO	(61):	
INTERNATIONAL CLASSIFICATION	(51):	A61K 37/02
DOMESTIC CLASSIFICATION	(52):	
PRIORITY COUNTRY	(33):	
PRIORITY NUMBER	(31):	
PRIORITY DATE	(32):	
INVENTOR	(72):	AZUMA, ICHIRO; SAIKI, IKUO; HIGASHI, ICHIRO.
APPLICANT	(71):	ICHIRO AZUMA; CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.
TITLE	(54):	CANCER METASTASIS INHIBITOR
FOREIGN TITLE	[54A]:	GAN' TEN'I YOKUSEIZAI

## Specifications

### 1. Title of the Invention

Cancer Metastasis Inhibitor

### 2. Claims

A cancer metastasis inhibitor comprising a human granulocyte colony stimulation factor as the active ingredient.

### 3. Detailed Specifications

(Field of Industrial Utilization)

The present invention relates to the invention of a drug, and in further detail, a cancer metastasis inhibitor which comprises a human granulocyte colony stimulation factor (abbreviated human G-CSF below) and is useful for treating cancer, and in particular, suppressing cancer metastasis.

(Prior Art)

Diagnosis of cancer in the early stage had advanced recently. Moreover, curing rates have improved due to technical enhancement in surgical techniques and radiation therapy and the development of immunotherapy agents. However, carcinoma cells have properties where they metastasize to locations apart from the main lesion; hence, a complete cancer treatment is still difficult. Therefore, one important task for existing cancer treatments is to develop a method for suppressing metastasis.

For the mechanism of cancer metastasis, recognizing a metastatic lesion is first verified via the following processes, that is, via

processes such as ① isolation of carcinoma cells from a primary lesion, ② interstitial migration (infiltration) of isolated carcinoma cells, ③ intravenous localization of carcinoma cells, ④ intraluminal localization of carcinoma cells, ⑤ washing up of carcinoma cells and ⑥ local attachment and proliferation of carcinoma cells. In addition, metastasis into the lungs, liver and bone, which are filtering organs in the circulation system, is often verified clinically.

However, the details of the mechanism of cancer metastasis mechanism naturally remain uncertain.

(Problems Which the Invention Intends to Solve)

In accordance with the respective processes thereof, up until now, this kind of mechanism of cancer metastasis has been the premise for promoting the development of a cancer metastasis inhibitor, but no highly effective drugs had been discovered yet. Therefore, a drug with high cancer metastasis suppressing action has been desired.

(Means Used to Solve the Problems)

Then as a result of painstaking research, the inventors of the present invention discovered that by administering human G-CSF into mice with highly metastatic carcinoma cells that metastasized into the lungs, liver or spleen, the number of carcinoma cells that metastasized to the respective organs decreased more significantly than in an unadministered group, and thus human G-CSF was useful as a cancer metastasis inhibitor, which led them to achieving the present



invention.

Namely, the present invention relates to a cancer metastasis inhibitor which comprises human G-CSF as the active ingredient and is particularly useful in the treatment of cancer.

The present invention will be explained in detail below.

G-CSF is a hemopoietic factor which acts on marrow precursor cells (CFU-GM or CFU-G), stimulating differentiation and growth, but the findings that it is effective in cancer metastasis inhibitors should be frequent.

While administering the cancer metastasis inhibitor of the present invention to a patient, the dosage, administration site, administration time and interval, and the like are determined by considering the disease condition of the patient subject.

The administration time refers to the time metastasis arises by stimulation caused by cancer extraction surgery, chemotherapeutic agents, and the like; hence, it is desirable that the cancer metastasis inhibitor be administered at the appropriate time before or after surgery. Moreover, radiation therapy is performed, as needed, and at the same time, advantages can be further anticipated by administering a chemotherapeutic or immunotherapeutic agent at the same time.

The human G-CSF human pertaining to the present invention can be administered as a drug preparation suited for medicinal use in humans or animals. This kind of preparation can be manufactured by

compounding the necessary carriers and excipients, and in further needed, a stabilizer, adsorption preventing agent, etc. according to a pharmaceutical manufacturing method. For example, this preparation can be used as an injection after dissolving it in distilled water or a suitable buffer.

When it is used according to the object of the present invention, it is administered 1 to 7 times per week as an injection and the adult dosage is 0.1 to 1,000 µg, and preferably, 1 to 500 µg.

Moreover, human G-CSF, which is the active ingredient of the cancer metastasis inhibitor of the present invention, is a substance known in the art. Its source is not restricted as long as it is highly pure. For example, any of the substances obtained in the methods described in Tokko No. 1-44200 or 2-5395, which were applied for by the applicant, can be used. Moreover, derivatives of human G-CSF also can be used. Of these, human G-CSFs comprising the amino acid sequence in the following Table I, polypeptides having human G-CSF activity expressed by a part of the sequence thereof, and glycoproteins having this polypeptide and a sugar chain are cited as preferred human G-CSFs.

Table I

(Met) <sup>n</sup>	Thr	Pro	Leu	Gly	Pro	Ala	Ser	Ser	Leu	
Pro	Gln	Ser	Phe	Leu	Leu	Lys	Cys	Leu	Glu	Gln
Val	Arg	Lys	Ile	Gln	Gly	Asp	Gly	Ala	Ala	Leu
Gln	Glu	Lys	Leu	(Val	Ser	Glu)	Cys	Ala	Thr	
Tyr	Lys	Leu	Cys	His	Pro	Glu	Glu	Leu	Val	Leu
Leu	Gly	His	Ser	Leu	Gly	Ile	Pro	Trp	Ala	Pro
Leu	Ser	Ser	Cys	Pro	Ser	Gln	Ala	Leu	Gln	Leu
Ala	Gly	Cys	Leu	Ser	Gln	Leu	His	Ser	Gly	Leu
Phe	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Leu	Gln	Ala	Leu	Glu
Gly	Ile	Ser	Pro	Glu	Leu	Gly	Pro	Thr	Leu	Asp
Thr	Leu	Gln	Leu	Asp	Val	Ala	Asp	Phe	Ala	Thr
Thr	Ile	Trp	Gln	Gln	Met	Glu	Glu	Leu	Gly	Met
Ala	Pro	Ala	Leu	Gln	Pro	Thr	Gln	Gly	Ala	Met
Pro	Ala	Phe	Ala	Ser	Ala	Phe	Gln	Arg	Arg	Ala
Gly	Gly	Val	Leu	Val	Ala	Ser	His	Leu	Gln	Ser
Phe	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Arg	Val	Leu	Arg	His
Leu	Ala	Gln	Pro							

(Provided that *m* and *n* represent 0 or 1, respectively.)

### Practical Examples

The present invention will be explained in further detail below by citing test examples (toxicity and pharmacological effect) and practical examples (preparation examples), but the present invention is not limited to these examples.

### Test Example 1 (Toxicity)

Upon performing an acute toxicity test on 6-week-old Slc:ddY mice (by intravenous injection) by using human G-CSF having the amino acid sequence described in Table I (*m*=0, *n*=0), the LD<sub>50</sub> was at least 1,000 µg/kg.

### Test Example 2 (Pharmacological Effect)

$2 \times 10^5$  highly metastatic Lewis lung carcinoma (3LL) cells were transplanted subcutaneously in the right feet of respective C57BL/6 mice (5 mice per group). Surgery for extracting the cancer was performed 18 days after the transplantation. Human G-CSF having the amino acid sequence described in Table I ( $m=0$ ,  $n=0$ ) was dissolved in a phosphate buffer and injected intravenously or subcutaneously for a total of 8 times up until 1 to 4 days and also 7 to 10 days after surgery at the dosages shown in Table II. A phosphate buffer only was administered to the control group. The mice were dissected 14 days after the surgery, and the results after measuring the number of colonies that metastasized to the lungs was shown in Table II. As a result, the human G-CSF administered group exhibited more significant and remarkable lung metastasis suppressing effects than in the control group  $2.0 \mu\text{g}/\text{mice}$  control group by both intravenous and subcutaneous administration.

Table II

Drug	Administration Route ( $\mu\text{g}/\text{mice}$ )	Dosage	No. of colonies metastasized (average $\pm$ standard deviation)
Control group			20 $\pm$ 4
Human G-CSF	Intravenous	0.2	17 $\pm$ 4
		2.0	1 $\pm$ 1*
Human G-CSF	Subcutaneous	0.2	9 $\pm$ 12
		2.0	4 $\pm$ 3*

\* $p < 0.001$

### Test Example 3 (Pharmacological Effect)

$2 \times 10^4$  highly metastatic L5178Y-ML25 lymphocytes were transplanted vascularily by injection into the liver and spleen of the respective CDF1 mice (5 mice per group). The human G-CSF having the amino acid sequence (m=0, n=0) described in Table I was dissolved in a phosphate buffer and injected intravenously at the dosages shown in Table II for a total of 8 times up to 1 to 4 days and 7 to 10 days after transplantation. Meanwhile, a phosphate buffer only was administered to the control group. The mice were dissected 17 days after transplantation, and the results after measuring the weight of the liver and spleen were shown in Table III. As a result, the human G-CSF administered group exhibited more significant and remarkable lung metastasis suppressing effects than in the control group  $2.0 \mu\text{g/mice}$  control group by both intravenous and subcutaneous administration.

Table III

Drug	Administration Route ( $\mu\text{g/mice}$ )	Dosage	Liver weight (g)	Spleen weight (average $\pm$ standard deviation)
Control group			$3.46 \pm 0.66$	$0.20 \pm 0.02$
Human G-CSF	Intravenous	2.0	$1.88 \pm 0.57^{**}$	$0.15 \pm 0.03^*$
Normal			$0.95 \pm 0.08$	$0.08 \pm 0.02$

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$

### Test Example 4 (Pharmacological Effect)

$5 \times 10^5$  highly metastatic B16-BL6 melanoma cells to the lungs were transplanted subcutaneously into the soles of the right feet of respective C57B/6 mice (5 mice per group). Surgery for extracting the

cancer was performed 21 days after the transplantation. Human G-CSF having the amino acid sequence (m=0, n=0) described in Table 1 was dissolved in a phosphate buffer and injected intravenously or subcutaneously a total of 8 times 1 to 4 days and 7 to 10 days after the surgery. The phosphate buffer only was administered to the control group. The mice were dissected 14 days after surgery. The results after measuring the number of colonies metastasized to the lungs were shown in Table IV. As a result, more significant lung metastasis suppressing effects are exhibited in the human G-CSF administered group than in the control group at the intravenous and subcutaneous dosages of 2.0 µg/mouse and the intravenous dosages of 0.2 µg/mouse.

Table IV

Drug	Administration Route (µg/mice)	Dosage	No. of colonies metastasized (average ± standard deviation)
Control group			43±9
Human G-CSF	Intravenous	0.2	22±12
		2.0	8±5*
Human G-CSF	Subcutaneous	0.2	18±5*
		2.0	10±7*

\*p<0.001

#### Practical Example 1 (Preparation Example)

0.1 mg/mL of Polysorbate 20 (Tween® 20: polyoxyethylene sorbin monolaureate), which is a nonionic surfactant, is added to 50 µg/mL of human G-CSF (10mM phosphate buffer; pH: 7) having the amino acid sequence described in Table I (m=0, n=0), the osmotic pressure ratio

in NaCl is adjusted to 1, and this is subsequently filtered and sterilized through a membrane filter having a 0.22  $\mu$ m pore size. A sterilized vial was filled with the obtained solution, plugged with a rubber stopper sterilized in the same way, and then screwed closed with an aluminum cap to obtain a solution for injection preparation. This solution for injection preparation is stored in a 10°C or colder cool, dark space.

#### Practical Example 2 (Preparation Example)

0.1 mg/mL of Polysorbate 80 (Tween° 80: polyoxyethylene sorbin monolaureate), which is a nonionic surfactant, is added to 100  $\mu$ g/mL of human G-CSF (10mM phosphate buffer; pH: 7) having the amino acid sequence described in Table I (m=0, n=1), the osmotic pressure ratio in NaCl is adjusted to 1, and this is subsequently filtered and sterilized through a membrane filter having a 0.22  $\mu$ m pore size. A sterilized vial was filled with the obtained solution, plugged with a rubber stopper sterilized in the same way, and then screwed closed with an aluminum cap to obtain a solution for injection preparation. This solution for injection preparation is stored in a 10°C or colder cool, dark space.

#### Practical Example 3 (Preparation Example)

0.1 mg/mL of Polysorbate 20 (Tween° 20: polyoxyethylene sorbin monolaureate), which is a nonionic surfactant, 10 mg/mL of HSA, and 50 mg/mL of mannitol are added to 50  $\mu$ g/mL of human G-CSF (10mM phosphate buffer; pH: 7) having the amino acid sequence described in Table I

(m=0, n=1) and dissolved, after which it is filtered and sterilized through a membrane filter having a 0.22  $\mu$ m pore size. A sterilized vial was filled with the obtained solution, half-plugged with a rubber stopper sterilized in the same way, and freeze-drying was performed to obtain a freeze-dried preparation for injection. This freeze-dried preparation for injection is stored at temperature conditions under room temperature and used by dissolving it in distilled water for injection before use.

#### Practical Example 4 (Preparation Example)

0.1 mg/mL of Polysorbate 80 (Tween<sup>®</sup> 80: polyoxyethylene sorbin monolaureate), which is a nonionic surfactant, 10 mg/mL of gelatin, and 50 mg/mL of mannitol are added to 100  $\mu$ g/mL of human G-CSF (10mM phosphate buffer; pH: 7) having the amino acid sequence described in Table I (m=1, n=1) and dissolved, after which it is filtered and sterilized through a membrane filter having a 0.22  $\mu$ m pore size. A sterilized vial was filled with the obtained solution, half-plugged with a rubber stopper sterilized in the same way, and freeze-drying was performed to obtain a freeze-dried preparation for injection. This freeze-dried preparation for injection is stored at temperature conditions under room temperature and used by dissolving it in distilled water for injection before use.

#### (Advantages of the Invention)

The cancer metastasis inhibitor comprising human G-CSF as the active ingredient of the present invention has excellent metastasis



suppressing effects on various cancers, but above all, it is useful in metastasis suppressing treatments before and after surgical procedures on early stage cancers.

Translation ordered  
4.29.

DERWENT-ACC-NO: 1992-136711  
DERWENT-WEEK: 200019  
COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Cancer metastasis inhibitors - comprising human  
granulocyte colony  
stimulating factor as active ingredient

PATENT-ASSIGNEE: CHUGAI PHARM CO LTD[CHUS]

PRIORITY-DATA: 1990JP-0188509 (July 17, 1990)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
JP 3022915 B2	March 21, 2000	N/A
005	A61K 038/00	
JP 04077436 A	March 11, 1992	N/A
004	N/A	

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
JP 3022915B2	N/A	1990JP-0188509
July 17, 1990		
JP 3022915B2	Previous Publ.	JP 4077436
N/A		
JP 04077436A	N/A	1990JP-0188509
July 17, 1990		

INT-CL\_(IPC): A61K037/02; A61K038/00 ; A61P035/04

ABSTRACTED-PUB-NO: JP 04077436A

BASIC-ABSTRACT: Inhibitors comprise human granulocyte  
colony stimulating factor  
(G-CSF) as an active ingredient.

USE/ADVANTAGE - The inhibitors can be administered to  
patients with cancer  
after or before operation in the form of injection. The  
daily dose of G-CSF is  
0.1-1000 micro-g, pref. 1-500 micro-g for adults. The LD50  
value is at least  
1000 micro-g/kg in mice (i.v.).

In an example, polysorbate 20 was added to human G-CSF (750

micro-g/ml) in 100  
micro-M phosphate buffer (pH 7) to a concn. of 0.1 mg/ml.  
After addn. of NaCl  
to an osmotic pressure ratio of 1, the mixt. was filtered  
with a membrane  
filter having a pore size of 0.22 micron. The filtrate was  
placed in a vial  
and closed to give an injectable prepn..

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/0

TITLE-TERMS:

CANCER METASTASIS INHIBIT COMPRISE HUMAN GRANULOCYTE COLONY  
STIMULATING FACTOR  
ACTIVE INGREDIENT

DERWENT-CLASS: B04

CPI-CODES: B04-B04D3; B12-G07;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 \*01\*

Fragmentation Code

D011 D601 F012 F014 F423 F521 G010 G013 G100 H1  
H100 H101 H181 H182 H4 H401 H441 H481 H498 H5  
H598 H8 H9 J0 J011 J012 J1 J111 J171 J172  
J3 J371 K0 L2 L250 M210 M211 M271 M280 M281  
M311 M312 M313 M314 M315 M320 M321 M331 M332 M333  
M340 M342 M343 M349 M371 M381 M391 M423 M510 M511  
M520 M521 M530 M531 M540 M620 M781 M903 P633 V901  
V917 V921

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1992-063474